

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 8 月 18 日 (18.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/074988 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/7088,  
48/00, A61P 25/28, 25/16, 25/02, 43/00

(KATO, Yukihiko) [JP/JP]; 〒2420028 神奈川県大和市  
桜森 2-4-14 レックス相模大塚駅前 205号  
Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002106

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 4 日 (04.02.2005)

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒  
1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビ  
ル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-031320 2004 年 2 月 6 日 (06.02.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会  
社ロコモジェン (LOCOMOGENE, INC.) [JP/JP]; 〒  
1050001 東京都港区虎ノ門 4-1-1 虎ノ門パスト  
ラル本館 7 階 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 利博  
(NAKAJIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒2240001 神奈川県  
横浜市都筑区中川 1-2 港北ガーデンヒルズ A  
棟 503号 Kanagawa (JP). 山崎 聡士 (YAMASAKI,  
Satoshi) [JP/JP]; 〒2250003 神奈川県横浜市青葉区  
新石川 2-16-7 石川坂マンション 305号  
Kanagawa (JP). 八木下 尚子 (YAGISHITA, Naoko)  
[JP/JP]; 〒2340053 神奈川県横浜市港南区日野中央  
2-39-9 コスモ港南台 507号 Kanagawa (JP).  
登那木 大樹郎 (TONAKI, Daijuro) [JP/JP]; 〒2150004  
神奈川県川崎市麻生区万福寺 2-19-6 パル  
テール新百合丘 102号 Kanagawa (JP). 加藤 幸裕

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NERVE CELL DIFFERENTIATION INDUCER

(54) 発明の名称: 神経細胞分化誘導剤

(57) Abstract: It is intended to provide a nerve cell differentiation inducer containing a synoviolin expression inhibitor which is a drug useful in treating nerve diseases, in particular, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, peripheral nerve injury or spinal injury. Examples of the synoviolin expression inhibitor include siRNA or shRNA to a gene (SEQ ID NO:1 or 2) encoding synoviolin, a decoy nucleic acid binding to the transcriptional factor of a synoviolin gene promoter to thereby inhibit the activity of the promoter, and an antisense oligonucleotide to a gene encoding synoviolin. This nerve cell differentiation inducer is useable in treating nerve system diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, peripheral nerve injury and spinal injury.

(57) 要約: 本発明は、神経疾患、特にアルツハイマー病、パーキンソン病、末梢神経障害又は脊髄損傷を治療するため  
に有用な薬剤である、シノビオリンの発現阻害物質を含む神経細胞分化誘導剤を提供する。シノビオリンの発現  
抑制物質としては、例えばシノビオリンをコードする遺伝子 (配列番号 1 又は 2) に対する siRNA 若しくは shRNA、  
シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合してプロモーター活性を阻害するデコイ核酸又はシノビオリン  
をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。本発明の神経細胞分化誘導剤は、  
アルツハイマー病、パーキンソン病、末梢神経障害又は脊髄損傷などの神経系疾患を治療するために使用される。

WO 2005/074988 A1

## 明 細 書

## 神経細胞分化誘導剤

## 5 技術分野

本発明は、シノビオリンの発現阻害物質を含む神経細胞分化誘導剤に関する。

## 背景技術

シノビオリンは、リウマチ患者由来滑膜細胞に存在する膜タンパク質として発見されたタンパク質である（WO02/05207）。遺伝子改変動物を用いた研究により、骨・関節の発生および関節症の発症に同因子が直接関与することが明らかとなったことから、シノビオリンは正常な骨形成又は四肢の発達に貢献するタンパク質であると考えられる。

また、シノビオリン（Synoviolin）は小胞体関連タンパク質分解(ERAD)に  
15 与するユビキチンリガーゼである。近年、家族性アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患の原因遺伝子が ERAD に関与することが明らかにされた（Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature. 2000 Jan 6; 403(6765): 98-103.）。

20 アルツハイマー病は、高齢化が進む現代において高い関心が払われている疾患の一つである。その最も重要な特徴は、脳に老人斑、すなわち繊維状の $\beta$ -アミロイドタンパク質（A $\beta$ ）の沈着が観察されることである。

しかし、シノビオリンの神経変性疾患への関連は、まだ明らかではない。

## 25 発明の開示

本発明は、神経疾患、特にアルツハイマー病又はパーキンソン病、末梢神経障害、脊髄損傷を治療するために有用な薬剤を提供することを目的とする。本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行なった結果、シノビオリンの発現を抑制すると、神経細胞が分化誘導されることを見出し、本発明を完成するに至っ

た。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) シノビオリンの発現阻害物質を含む神経細胞分化誘導剤。

シノビオリンの発現抑制物質としては、例えばシノビオリンをコードする遺伝子（配列番号 1 又は 2）に対する siRNA 若しくは shRNA、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害するデコイ核酸又はシノビオリンをコードする遺伝子（配列番号 1 又は 2）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。

siRNA は、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列（例えば配列番号 3 に示す配列）、あるいは配列番号 2 に示す塩基配列のうち一部の配列（例えば配列番号 4 に示す配列）を標的とすることができる。

デコイ核酸としては、例えば、以下の（a）又は（b）に示すデコイ核酸が挙げられる。

（a）配列番号 6 若しくは 7 に示される塩基配列からなるデコイ核酸

（b）配列番号 6 若しくは 7 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

また、デコイ核酸は、以下の（a）又は（b）に示すデコイ核酸でもよい。

（a）配列番号 6 及び 7 に示される塩基配列からなるデコイ核酸

（b）配列番号 6 及び 7 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

上記デコイ核酸は、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害することによりシノビオリンの発現を阻害するものである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とすることができる。

本発明の神経細胞分化誘導剤は、アルツハイマー病、パーキンソン病、末梢神経障害又は脊髄損傷などの神経系疾患を治療するために使用される。

(2) シノビオリンの発現を抑制することを特徴とする、神経細胞の分化を誘導する方法。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、シノビオリンの発現を siRNA で阻害することにより、神経細胞分化が  
5 誘導されたことを示す図である。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、シノビオリンの神経変性疾患への関連を明らかにすることを目的とし、まず神経細胞におけるシノビオリンの機能解析を行った。その結果、シノビ  
10 オリンの発現を阻害すると、神経細胞におけるによる細胞分化が誘導されることを見出した。

### <神経細胞の分化>

15 神経細胞の分化とは、ある種の細胞が神経細胞への形態変化をすること、及び神経細胞として機能し得るようになるまで分化することのいずれか又は両者を意味する。ある種の細胞が、神経細胞様の形態変化及び/又は機能変化を示したときに、神経細胞の分化が誘導されたと判断する。神経細胞の由来又は種類等は特に限定されるものではなく、ヒト由来の細胞（ヒト患者由来細胞、健常人由来細胞）  
20 胞）でも、ラットやマウス由来の細胞であってもよい。また、細胞の種類としては、例えば未分化神経細胞、幹細胞、株化細胞等が挙げられる。幹細胞は、ex vivo で神経細胞に分化させてこれを移植することで、神経系疾患の治療（再生医療）などに使用することができる。株化細胞としては、例えばラット PC-12 細胞、マウス Neuro2a 細胞、ヒト NB-1 細胞などが挙げられる。

25

### <シノビオリンの発現阻害>

また、シノビオリンの発現阻害についても、その手法は特に限定されるものではなく、例えば RNA 干渉（RNA interference: RNAi）、デコイ核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用することができる。

## 1. RNA 干渉

シノビオリン遺伝子に対する siRNA(small interfering RNA)を設計及び合成し、これを細胞内に導入させることによって、RNAi を引き起こすことができる。

5 RNAi とは、dsRNA(double-strand RNA)が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害する現象である。例えば、dsRNA を細胞内に導入すると、その RNA と相同配列の遺伝子の発現が抑制（ノックダウン）される。

siRNA の設計は、例えば、以下の通り行なうことができる。

10 (a) シノビオリンをコードする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、任意の領域を全て候補にすることが可能である。例えば、ヒトの場合では、GenBank Accession number AB024690（配列番号 1）の任意の領域を候補にすることができ、マウスの場合では Accession number NM\_028769（配列番号 2）の任意の領域を候補にすることができる。

15 (b) 選択した領域から、AA で始まる配列を選択し、その配列の長さは 19～25 塩基、好ましくは 19～21 塩基である。その配列の GC 含量は、例えば 40～70% となるものを選択するとよい。具体的には、配列番号 1 又は 2 に示される塩基配列のうち、以下の塩基配列を含む DNA を siRNA の標的配列として使用することができる。

シノビオリン siRNA1 : CGT TCC TGG TAC GCC GTC A（配列番号 3）

20 シノビオリン siRNA2 : GAA ATG GTG ACT GGT GCT A（配列番号 4）

シノビオリン siRNA1 は、配列番号 1 に示される塩基配列のうち 640～658 番目の領域を標的とした配列である。また、シノビオリン siRNA2 は、配列番号 2 に示される塩基配列のうち 1373～1391 番目の領域を標的とした配列である。

25 siRNA を細胞に導入するには、in vitro で合成した siRNA をプラスミド DNA に連結してこれを細胞に導入する方法、2 本の RNA をアニールする方法などを採用することができる。

また、本発明は、RNAi 効果をもたらすために shRNA を使用することもできる。shRNA とは、ショートヘアピン RNA(short hairpin RNA)と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有する

RNA 分子である。

shRNA は、その一部がステムループ構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列 A とし、配列 A に対する相補鎖を配列 B とすると、配列 A、スペーサー、配列 B の順になるようにこれらの配列が一本の RNA 鎖に存在するようにし、全体で 45～60 塩基の長さとなるように設計する。配列 A は、標的となるシノビオリン遺伝子（配列番号 1 又は 2）の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されるものではなく、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列 A の長さは 19～25 塩基、好ましくは 19～21 塩基である。

10

## 2. デコイ核酸

本発明のデコイ核酸は、転写因子の結合部位を含む短い『おとり核酸』を意味する。この核酸を細胞内に導入すると、転写因子がこの核酸に結合することにより、転写因子の本来のゲノム結合部位への結合が競合的に阻害され、その結果、その転写因子の発現が抑制されるような機能を有する。代表的には、デコイ核酸は核酸又はその類似体であり、転写因子に結合しうる核酸を少なくとも一つ含む。

15

本発明の好ましいデコイ核酸の例は、例えば、シノビオリンプロモーター中の構成的発現を担う Ets 結合部位である EBS に結合する転写因子と結合し得る核酸、プロモーターの転写因子結合部位である ABS(AML binding site)に結合する転写因子と結合し得る核酸、プロモーターの転写因子結合部位である SBS(Sp1 binding site)に結合する転写因子と結合し得る核酸、これらの相補体を含むオリゴヌクレオチド、これらの変異体、又はこれらを分子内に含む核酸などが挙げられる。デコイ核酸は、上記 EBS、ABS 又は SBS の配列をもとに、1 本鎖、又はその相補鎖を含む 2 本鎖として設計することができる。長さは特に限定されるものではなく、15～60 塩基、好ましくは 20～30 塩基である。

20

25

本発明においては、例えば EBS に結合する転写因子と結合し得る核酸（配列番号 6）及び/又はその相補鎖（配列番号 7）をデコイ核酸として好ましく使用することができる。

核酸は、DNA でも RNA でもよく、またはその核酸内に修飾された核酸及び/

又は擬核酸を含んでいてもよい。またこれらの核酸、その変異体、又はこれらを分子内に含む核酸は、1本鎖又は2本鎖であってもよく、また環状でも線状でもよい。変異体とは、上記デコイ核酸配列の1又は数個（例えば1個～10個、1個～5個又は1個～2個等）の塩基が、欠失、置換又は付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能、すなわち、転写因子と結合する機能を有する核酸をいう。上記塩基配列を1つ又はそれ以上含む核酸であってもよい。

本発明で用いられるデコイ核酸は、当業界で公知の化学合成法又は生化学的合成法を用いて製造することができる。例えば、遺伝子組換え技術として一般的に用いられるDNA合成装置を用いた核酸合成法を使用することができる。また、鑄型となる塩基配列を単離又は合成した後に、PCR法又はクローニングベクターを用いた遺伝子増幅法を使用することもできる。さらに、これらの方法により得られた核酸を、制限酵素等を用いて切断し、DNAリガーゼを用いて結合することにより所望の核酸を製造してもよい。さらに、細胞内でより安定なデコイ核酸を得るために、塩基等にアルキル化、アシル化等の化学修飾を付加することができる。デコイ核酸の変異体の作製方法は、当業界で公知の方法を用いて、たとえば、部位特異的突然変異誘発法等によって合成することもできる。部位特異的突然変異誘発法は当分野において周知であり、市販のキット、例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km等（タカラバイオ社製））を使用することができる。

デコイ核酸を使用した場合のプロモーターの転写活性の解析は、一般的に行なわれるルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、CATアッセイ等を採用することができる。これらのアッセイを行なうためのキットも市販されている（例えば promega dual luciferase assay kit）。

例えばルシフェラーゼアッセイの場合は、目的遺伝子の転写開始点の上流にレポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結する。また、アッセイの対象となる細胞間の導入効率を補正するために、サイトメガロウイルス（CMV） $\beta$ ガラクトシダーゼ（ $\beta$ -gal）遺伝子をレポーターとしてプロモーターの下流につない

だベクターを細胞に同時に導入してもよい。細胞への導入は、例えばリン酸カルシウム法等を採用することができる。ベクターを導入した細胞は所定時間培養した後回収し、凍結－融解等によって細胞を破壊した後、一定量の細胞抽出液を用いてルシフェラーゼ及び $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を測定する。

5

### 3. アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとは、シノビオリン遺伝子をコードする塩基配列に相補的な配列を有するヌクレオチドをいう。このアンチセンスオリゴヌクレオチドが、シノビオリン遺伝子をコードする塩基配列の全部又は一部とハイブリッドを形成すると、シノビオリン遺伝子の発現を阻害し、シノビオリ  
10    ンタンパク質の合成を効率よく阻害することができる。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明のシノビオリン遺伝子の RNA 又は本発明のシノビオリン関連 RNA の全部又は一部とハイブリダイズすると、上記の RNA の合成又は機能が阻害されるか、あるいは本発明のシノビオリン関連 RNA との  
15    相互作用を介して本発明のシノビオリン遺伝子の発現が調節・制御されうる。

本発明の好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、例えば、本発明のシノビオリン遺伝子の 5'端ヘアピンループ、5'端 6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、翻訳終止コドン、3'端非  
20    翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および 3'端ヘアピンループなどの配列に対して相補的な配列が挙げられるが、シノビオリン遺伝子内のいかなる領域も対象領域として選択しうる。具体的には、(イ) 翻訳阻害を指向したアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合は、本発明のシノビオリンの N 末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）と相補的な配列が好ま  
25    しく、(ロ) RNaseH による RNA 分解を指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のシノビオリン遺伝子をコードする塩基配列に相補的な配列が好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記の配列をもとに、1 本鎖、又はその相補鎖を含む 2 本鎖、さらには DNA : RNA ハイブリッドとして設計することができる。長さは特に限定されるものではなく、通常、10～40 塩基、好ましくは 15～30 塩基である。



本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA でも RNA でもよく、またはその核酸内に修飾された核酸及び/又は擬核酸を含んでいてもよい。またこれらの核酸、その変異体、又はこれらを分子内に含む核酸は、1 本鎖又は 2 本鎖でもよい。変異体とは、上記の配列の 1 又は数個（例えば 1 個～10 個、1 個  
5 ～5 個又は 1 個～2 個等）の塩基が、欠失、置換又は付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子の発現を阻害する機能を有するヌクレオチドをいい、アンチセンスオリゴヌクレオチド自体が、配列番号 1 又は 2 で表される塩基配列を有する DNA にハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。上記塩基配列を 1 つ又はそれ以上含むヌクレオチドであってもよい。

- 10 本発明で用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成、変異導入、修飾等は、前記デコイ核酸の項で記載した内容と同様に行うことができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドの阻害活性は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが導入された形質転換体、その形質転換体を用いた生体内や生体外の遺伝子発現系などを用いて調べることができる。

15

#### <本発明の医薬組成物>

本発明において作製された shRNA 又は siRNA、デコイ核酸及びアンチセンスオリゴヌクレオチドは、シノビオリンの発現を阻害する物質であり、神経細胞の分化誘導を目的とした医薬組成物（神経系疾患の遺伝子治療剤）として使用する  
20 ことができる。

本発明の医薬組成物を神経系疾患の遺伝子治療剤として使用する場合は、脳（大脳、間脳、中脳、小脳）、延髄、脊髄などの中枢神経系および末梢神経を対象として適用される。

神経系疾患としては、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン  
25 ン舞踏病、末梢神経障害、脊髄損傷などが挙げられる。

上記神経系疾患は、単独であっても、併発したものであってもよい。

本発明の医薬組成物は、shRNA 若しくは siRNA、デコイ核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチドが患部の細胞内又は目的とする組織の細胞内に取り込まれるような形態で用いられる。

本発明の医薬組成物の投与形態は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。経口投与の場合は、適当な剤型、例えば錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物により投与が可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に直接的又は間接的に患部に投与することができる。

本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。本発明の医薬組成物を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クロンテック社）を用いることもできる。

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。本発明の医薬組成物を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等から全身投与する。脳等に局所投与することもできる。リポソーム構造を形成するための脂質としては、リン脂質、コレステロール類や甾素脂質等が用いられるが、一般に、リン脂質が好適であり、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイルノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン等の天然リン脂質、あるいはこれらを定法に従って水素添加したものが挙げられる。また、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン等の合成リン脂質を用いるこ

とができる。

リポソームの製造方法は、siRNA 若しくは shRNA、デコイ核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチドが保持されるものであれば特に限定されるものではなく、慣用の方法、例えば、逆相蒸発法(Szoka, F ら、Biochim. Biophys. Acta, Vol. 601 559 (1980))、エーテル注入法(Deamer, D.W.: Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol.308 250 (1978))、界面活性剤法(Brunner, J ら: Biochim. Biophys. Acta, Vol. 455 322 (1976))等を用いて製造できる。

これらのリン脂質を含む脂質類は単独で用いることができるが、2 種以上を併用することも可能である。このとき、エタノールアミンやコリン等の陽性基をもつ原子団を分子内に有するものを用いることにより、電氣的に陰性のデコイ核酸の結合率を増加させることもできる。これらリポソーム形成時の主要リン脂質の他に一般にリポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール類、ステアリルアミン、 $\alpha$ -トコフェロール等の添加剤を用いることもできる。このようにして得られるリポソームには、患部の細胞又は目的とする組織の細胞内への取り込みを促進するために、膜融合促進物質、例えば、センダイウイルス、不活化センダイウイルス、センダイウイルスから精製された膜融合促進タンパク質、ポリエチレングリコール等を添加することができる。

本発明の医薬組成物は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容されるキャリアーを含むものであってもよい。このようなキャリアーは添加物であってもよく、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組

み合わせて選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製されたデコイ核酸を溶剤(例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等)に溶解し、これに Tween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば以下のものが挙げられる。すなわち、マンニトール、ブドウ糖、ラクトース等の糖類、トウモロコシ、コムギ、その他の植物由来のデンプン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はカルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース、アラビアゴム、トラガカントゴム等のゴム、ゼラチン、コラーゲン等である。所望により、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸又はその塩(例えば、アルギン酸ナトリウム)等の崩壊剤又は可溶化剤を使用することができる。

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なる。投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、疾患の徴候又は状態を軽減する siRNA 若しくは shRNA、デコイ核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの量である。例えば、デコイ核酸では、治療効果及び毒性は、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的手順、例えば ED50 (集団の 50%において治療的に有効な用量)、あるいは LD50 (集団の 50%に対して致死性である用量)によって決定され得る。

治療効果と毒性効果との間の用量比は治療係数であり、ED50/LD50 として表され得る。本発明の医薬組成物の投与量は、例えば1回につき体重 1kg あたり 0.1  $\mu$ g~100mg、好ましくは 1~10  $\mu$ g である。但し、上記治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。例えば、アデノウイルスを投与する場合の投与量は、1日1回あたり  $10^6$ ~ $10^{13}$  個程度であり、1週~8週間隔で投与される。但し、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### [実施例1]

##### siRNA を用いた神経細胞の分化誘導試験

### <材料及び方法>

本実施例は、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞を使用した。なお、Neuro2a 細胞は、血清除去、薬剤添加により軸索を伸長し、分化能を有する細胞である。Neuro2a 細胞は Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) に  
5 10%Fetal Calf Serum (FCS)、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した培地を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。Neuro2a 細胞を播種し(4×10<sup>4</sup>cells/60mm dish)、24 時間培養した。シノビオリンをコードする遺伝子(配列番号 1 又は 2) に対する short interfering RNA (siRNA)2 種類、およびコントロールとして Green Fluorescent Protein (GFP)遺伝子に対する siRNA  
10 を Oligofectamine™ Reagent (Invitrogen 社)を用いてトランスフェクションした。

siRNA は終濃度 100nM とし Oligofectamine™ Reagent は 8μL 使用した。トランスフェクション時は、無血清、無抗性物質の培地とし、トランスフェクションより 4 時間後、10%FCS を加え培養を続けた。

15 siRNA 作製のための標的配列は以下の通りである。

シノビオリン siRNA1 : CGT TCC TGG TAC GCC GTC A (配列番号 3)

シノビオリン siRNA2 : GAA ATG GTG ACT GGT GCT A (配列番号 4)

GFP siRNA : GGC TAC GTC CAG GAG CGC A (配列番号 5)

### <結果>

20 トランスフェクションより 2 日後、シノビオリンに対する両 siRNA を導入した細胞において、軸索の伸長等の細胞の形態変化が観察された(図 1)。

シノビオリン siRNA1、シノビオリン siRNA2 をトランスフェクションした細胞(それぞれ図 1 パネル(A)、パネル(B))は、対照として使用した GFP に対する siRNA (GFP siRNA)(図 1 パネル(C))と比較して、軸索が伸長した細胞が多いこと  
25 が観察された。GFP に対する siRNA では変化は見られなかった。

### 産業上の利用可能性

本発明により、シノビオリンの発現抑制物質を含む神経細胞分化誘導剤が提供される。本発明の誘導剤は、アルツハイマー病、パーキンソン病、末梢神経障害

又は脊髄損傷などの神経系疾患治療薬として有用である。

配列表フリーテキスト

配列番号 5 : 合成DNA

5 配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

## 請 求 の 範 囲

1. シノビオリンの発現阻害物質を含む神経細胞分化誘導剤。
2. シノビオリンの発現阻害物質が、シノビオリンをコードする遺伝子に対す  
5 る siRNA 又は shRNA である請求項 1 記載の誘導剤。
3. シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号 1 又は 2 に示される塩基配  
列を含むものである請求項 2 記載の誘導剤。
4. siRNA が、配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的と  
するものである請求項 2 記載の誘導剤。
- 10 5. 一部の配列が、配列番号 3 又は 4 に示す塩基配列を有するものである請求  
項 4 記載の誘導剤。
6. シノビオリンの発現阻害物質が、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転  
写因子と結合してプロモーター活性を阻害するデコイ核酸である請求項 1 記  
載の誘導剤。
- 15 7. デコイ核酸が、以下の (a) 又は (b) に示すデコイ核酸である請求項 6  
記載の誘導剤。  
(a) 配列番号 6 若しくは 7 に示される塩基配列からなるデコイ核酸  
(b) 配列番号 6 若しくは 7 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基  
が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺  
20 伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸
8. デコイ核酸が、以下の (a) 又は (b) に示すデコイ核酸である請求項 6  
記載の誘導剤。  
(a) 配列番号 6 及び 7 に示される塩基配列からなるデコイ核酸  
(b) 配列番号 6 及び 7 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠  
25 失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子  
のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸
9. シノビオリンの発現阻害物質が、シノビオリンをコードする遺伝子に対す  
るアンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項 1 記載の誘導剤。
10. シノビオリンをコードする遺伝子が配列番号 1 又は配列番号 2 に示され

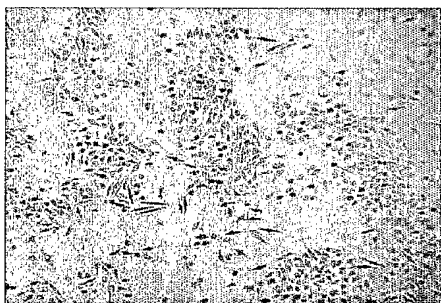
る塩基配列を含むものである請求項 9 記載の誘導剤。

- 1 1. アンチセンスオリゴヌクレオチドが配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 9 記載の誘導剤。
- 1 2. 神経系疾患を治療するための請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の誘導剤。
- 1 3. 神経系疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、末梢神経障害又は脊髄損傷である請求項 1 2 記載の誘導剤。
- 1 4. シノビオリンの発現を阻害することを特徴とする、神経細胞の分化を誘導する方法。

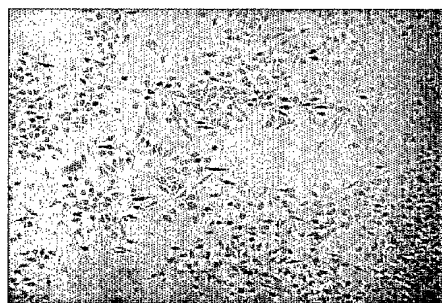


図 1

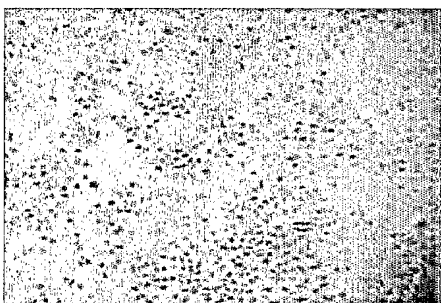
(A)



(B)



(C)



## SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> A method of inducing a differentiation of a cell to a neurocyte

<130> PCT05-0003

<150> JP2004-31320

<151> 2004-02-12

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 3374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gccctttctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga gggtaataat gacttgttgg      60
ttgattgtag atatagggtc ctcccttgca aggttaattag gctcctaaa ttacctgtaa     120
gattttcttg ccacagcatc cattctgggt aggctggtag tctctgagt agtgatagat     180
tggttggtag tgaggtttac aggtgttccc ttctcttact cctgggtgtg gctacaatca     240
ggtggcgctc agagcagcat gggacagggt ggtaagggga gtcttctcat tatgcagaag     300
tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc tttatgtagc ccggcagtcg cgcggattga     360
gctgggtcgc ggcgttgggt tctgtgtctc cgggccaggg caatgttccg cacggcagtg     420
atgatggcgg ccagcctggc gctgaccggg gctgtgtgtg ctacgccta ctacctcaaa     480

```

caccagtctt accccactgt gggtaccctg accaagtcca gcccagcat ggcagtcctg 540  
tacatccagg cctttgtcct tgtcttcctt ctgggcaagg tgatgggcaa ggtgttcttt 600  
gggcaactga gggcagcaga gatggagcac ctcttggaac gtccctggta cgcctgcaca 660  
gagacttgtc tggccttcac cgtttttcgg gatgacttca gccccgctt tgttgcactc 720  
ttcactcttc ttctcttcct caaatgtttc cactggctgg ctgaggaccg tgtggacttt 780  
atggaacgca gcccacacat ctccctggctc ttctactgcc gcattgtctc tcttatgttc 840  
ctccctggga tccctggactt cctcttcgtc agccacgcct atcacagcat cctgaccctg 900  
ggggcctctg tgcagctggg gtttggcttt gagtatgcca tccctgatgac gatggtgctc 960  
accatcttca tcaagtatgt gctgcactcc gtggacctcc agagtggaga cccctgggac 1020  
aacaaggctg tgtacatgct ctacacagag ctgtttacag gcttcatcaa ggttctgctg 1080  
tacatggcct tcatgacat catgatcaag gtgcacacct tcccactctt tgccatccgg 1140  
cccatgtacc tggccatgag acagtccaag aaagctgtga cagatgcat catgtctcgc 1200  
cgagccatcc gcaacatgaa caccctgtat ccagatgcca cccagagga gctccaggca 1260  
atggacaatg tctgcatcat ctgccgagaa gagatggtag ctggtgcaa gagactgccc 1320  
tgcaaccaca ttttccatac cagctgcctg cgctcctggg tccagcggca gcagacctgc 1380  
cccacctgcc gtatggaagt ccttcgtgca tgcctgccag cgcagtcacc accacccccg 1440  
gagcctgcgg atcaggggcc accccctgcc cccaccccc caccactctt gctcagccc 1500  
cccaacttcc cccagggcct cctgcctcct ttctctccag gcatgttccc actgtggccc 1560

cccatgggcc cctttccacc tgtcccgct cccccagct caggagaggc tgtggctcct 1620  
ccatccacca gtgcagcagc cttttctgg ccagtgag cagctacaac cacagctgct 1680  
ggcaccagtg ctactgtgc ttctgccaca gcatctggcc caggctctgg ctctgcccc 1740  
gaggctggcc ctgccccctgg tttccccctt cctctccct ggaagggtat gccccctgct 1800  
ccaccccttg ccttcccccc aatgcctgig cccccgagg gctttgtgg gctgaccca 1860  
gaggagctac gagctctgga gggccatgag cggcagcacc tggaggcccg gctgcagagc 1920  
ctgcgtaaca tccacacact gctggagcc gccatgtgc agatcaacca gtacctacc 1980  
gtgctggcct ccttggggcc cccccggcct gccacttcag tcaactccac tgaggggact 2040  
gccactacag ttgttgtgc tgcctcctcc accagcatcc ctgctcaga ggccagacc 2100  
ccaacccag gagcctcccc accagcccct gaaatggaaa ggcctccagc tcctgagtca 2160  
gtgggcacag aggagatgcc tgaggatgga gagccgatg cagcagagct ccgccggcgc 2220  
cgctgcaga agctggagtc tcctgttgcc cactgacact gccccagccc agccccagcc 2280  
ctgtctctt tgagcagccc tgcctggaac atgtcctgcc accaagtgcc agctccctct 2340  
ctgtctgcac cagggagtag tacccccagc ctgagaaaag aggcggcac ccctaggcca 2400  
agtggaaaga ggctgggggt cccatttgac tccagtcca ggcagccatg gggatctcgg 2460  
gtcagttcca gccttctct ccaactctt agccctgtgt ctgtctgggg ccatgaaggc 2520  
agaaggitta gccctgaga agccctctt tccccacc cctttccagg agaaggggct 2580  
gcccciccaa gccctacttg tatgtcgga gtcacactgc agtgccgaac agtattagct 2640

cccgttccca agtgtggact ccagaggggc tggaggcaag ctatgaactt gctcgctggc 2700  
 ccacccctaa gactgggtacc catttccitt tcttaccctg atctccccag aagcctcttg 2760  
 tgggtggtagc tgtgccccct atgccccttg gcatttctgc gtcttactgg caaccacaca 2820  
 actcagggaa aggaatgcct gggagtgggg gtgcaggcgg gcagcactga gggaccctgc 2880  
 cccgccccct cccccaggcc ctttccctt gcagcttctc aagttagact gacctgtctc 2940  
 acccagcagc cactgcccag ccgcactcca ggcaagggcc agtgcgcctg ctctgacca 3000  
 ctgcaatccc agcgcccaag gaaggccact tctcaactgg cagaacttct gaagtttaga 3060  
 attggaatta ctctcttact agtgcctttt ggctttaaatt ttgtcttttg aagttagatg 3120  
 cttaatcccg ggaaagagga acaggagtgc cagactcctg gtctttccag tttagaaaag 3180  
 gtctgtgcc aaggaggagc cacaggagct gggacctgcc tggccctgtc ctttccctt 3240  
 ggttttgtgt tacaagagtt gttggagaca gtttcagatg attattttaa ttgtaaatat 3300  
 tglacaaatt ttaatagctt aaattgtata tacagccaaa taaaaacttg cattaacaaa 3360  
 aaaaaaaaaa aaaa 3374

<210> 2

<211> 3388

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

gtcgtagcta tccctggaat gaggcgccta cacattttat ttctttcatg cctgacataa 60

agtctggccc ttgctcgctc ctgcccccg tccaaatggc tcggcccgcg gaacgcccc 120  
tcttccagge acattgagag cggagtcctt ggaggagttt agggtagtga ttctacaacg 180  
gcgactagca agtggcgggc ttcagccctt tcccgtgct ctcctggtcg cgaccacacg 240  
tcacagctct cgctcgttcc ggttgctcgc gcacgggccc cagaagcgca ggcgagatcg 300  
gagcgcgcaa agagaacttg gtacgtcca ctccgcgcg cccgcgcgcg ccggaagtga 360  
ggtgtcttac cccgaagtt ccggttcgca ggggtgggg agtgttgta accggagcgg 420  
ctgccgcagt cgcggtgatt gagcgtgctc gggcgctgg gctcctggtc tctgggccag 480  
ggcgatgttc cgcaccgcag tgatgatggc ggccagcctg gcgctaaccg gggcagtggt 540  
ggctcatgcc tactacctca aacaccagtt ctacccact gtagtgtatt tgaccaagtc 600  
cagccccagc atggcagtcc tgiacatcca ggctttgtc cttgtcttcc tcttgggcaa 660  
ggtgatgggc aaggtgttct tcgggcagct gagggcagca gagatggagc accttcigga 720  
acggtccigg tacgtgtta ctgagacttg tttggccttc accgttttc gggatgactt 780  
cagccctcgc tttgtggcgc tctttacgt gctcctcttc ctcaaagtgt tccattggtt 840  
ggctgaagac cgtgtggact ttatggaacg cagccccaac atctcctggc tcttccactg 900  
ccgcatcgtc tctctcatgt ttctcctggg tatectggac ttctcttcg tcagccacgc 960  
ttatcacagc atctgaccc gtggggcttc tgtgcagctg gtatttggt ttgagtacgc 1020  
cattctgatg accatggtc ttaccatctt catcaagtat gtgctgcact ccgtggacct 1080  
ccagagcgag aaccctggg acaacaaggc tgtatacatg ctctacacgg agctgtttac 1140

aggcttcatc aaggtcctgc tgtacatggc cttcatgacc atcatgatca aggtgcacac 1200  
attcccactc ttigccatta ggcccatgta cctggccatg aggcagtca agaaagctgt 1260  
gacagatgcc atcatgtctc gccgagccat cgcgaacatg aacacactgt acccagatgc 1320  
cacccccgag gagctccagg cagtggataa tgtctgtatc atctgcagag aagaaatggt 1380  
gactgggtgct aagagattgc cttgcaacca catctttcac acgagctgcc tgcgctcctg 1440  
gttccagaga cagcagacct gcccgacatg ccgcatggat gtccctgcggg catcgttgcc 1500  
agcccagtca ccaccacctc ctgagcctgc tgaccaagga ccaccccccg cccctcatcc 1560  
ccaaccgctg ctgccacagc cccctaattt cccccagggc ctccctgcctc ctttctctcc 1620  
aggcatgttc ccactgtggc cccaatggg tccctttcca cctgtccgc ccccccaag 1680  
ctcaggagag gctgcggccc ctccaccac cagtacagcc gttctcggc ctagtgagc 1740  
agccaccacc acagctgctg gcaccagtac ttctgcccc gcacctgggt ctgtacctg 1800  
cccagaggct ggtccctgcc ccggttccc ttccctctct ccttgatgg gtaigcctct 1860  
gcctccacct ttgcttcc cccaatgcc tgtgccccct gcgggctttg ctggcctaac 1920  
cccagaggag ctgcgagcac tagaggcca tgagcggcag cacttgagg cccggctgca 1980  
gagtctgcgc aacatacaca cactactgga tgtgccatg ctcaaata accagtacct 2040  
cactgtgctg gcttccctgg ggccccccag gccagctact tcagtaacc ccactgaaga 2100  
gactgcctct acagtggat ctgctgccc ttccaccagc gccccagct ctgaggctcc 2160  
taccctct cccggagctt cccaccaat tcctgaagca gaaaagcctc ctgctcctga 2220

gtcagtgggc attgtagagg agcttcccga ggacggagag cctgatgctg cagaactccg 2280  
ccggcgtcgc ctgcagaagc tggagtcgcc tgttgccac tgacacigcc 'cagacciggc 2340  
ccgtttctct tgagtggccc tcaciggaac acgtcctgcc atcaagtgcc agtccctct 2400  
ctgcttgac cagggagtaa tagccccagt tgagaaagac ttggcaggat ctctgaggat 2460  
caaggagaag tgtctgggct tccagtigat ccatccccag tgcccciggc agccaigag 2520  
atactggta gctctaacct cctccactt ctgccaigt caactggggc ctcaaagta 2580  
gaagctgaat ctctggtaag ccttctcttc catgctttct gggagaaggt gaagcccctc 2640  
caagccctgc ttgtgagtat gggaccatgc tgcagtgcg aacagtatta gcttctgttc 2700  
ccaagtgtgg aaaccagag gggctgaaga cagaccagga ccttgccca cctcctgcc 2760  
aagactgta ccagctctt tctctagcc cagtcttccc agaaccctt tgtgatggtg 2820  
gctgtgcccc ccgaagccct gtggcatttc catgtcttac tggcaaccac acaactcagg 2880  
gaaaggagtg cctgggggtg gggcacaggc gggcagcact gagggaccct gccctgcccc 2940  
tcccagctc tttcccac tcaccagca gccactgcct ggtgggcctg gctaagggtg 3000  
tgtgtgctc cttaaaccac tgcctcccag aaccaaggc aggccacct caacctgtg 3060  
gatgtctca ggaatggaac tattctgtac ctactggctt tggcctaaa tttgtcttc 3120  
tgaatttgaa tgcttgacc caggaaggag gagcaggtgt gggcctaggt acctggactt 3180  
cgcagtttag aacaagctct gggccgggcc gggccaggcc aggcctaggg agccaaggcc 3240  
tagctgtgc ttccttctt tggttttgt ttacaggagt ttctggagag tttcagaiga 3300



ttattttaatt tgtaaataatt gtataaatit taatagctta aattgtatat acagctcaat 3360

aaaaacttgc attaaaaaaaa aaaaaaaaa 3388

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cgttcctggt acgccgtca 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

gaaatggtga ctggtgcta 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 5

ggctacgtcc aggagcgca 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 6

gcgccgccgg aagtgaggtg

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 7

cacctcactt ccggcggcgc

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002106

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P25/28, 25/16, 25/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P25/28, 25/16, 25/02, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN),  
EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2002/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), (Family: none)	1-13
A	WO 2002/016620 A2 (Akusodia Ltd.), 28 February, 2002 (28.02.02), & JP 2004-522414 A & EP 1309706 A2 & US 2004/0053869 A1	1-13
A	WO 2000/055323 A1 (MITOKOR), 21 September, 2000 (21.09.00), & JP 2003-524397 A & EP 1161534 A1	1-13
A	WO 2002/026977 A1 (Cell Free Sciences Co., Ltd.), 04 April, 2002 (04.04.02), & AU 7446700 A & GB 2385054 A	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 March, 2005 (29.03.05)

Date of mailing of the international search report  
12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/002106

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002106

### <Subject of search>

Claim 1 relates to a medicinal composition containing a compound defined by a desired property "synoviolin expression inhibitor". Although claim 1 involves any compounds having this property, it appears that only small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of compounds having the property as "synoviolin expression inhibitor" cannot be specified. Thus, claim 1 does not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made exclusively on the relationship between the inhibition of synoviolin expression and the induction of nerve cell differentiation and nerve cell differentiation inducers containing siRNA or shRNA to a gene encoding synoviolin, a decoy nucleic acid binding to the transcriptional factor of a synoviolin gene promoter to thereby inhibit the activity of the promoter, and an antisense oligonucleotide to a gene encoding synoviolin which are specified in claims 3 to 11.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P25/28, 25/16, 25/02, 43/00</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P25/28, 25/16, 25/02, 43/00</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>														
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)</p> <p>EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2002/052007 A1 (株式会社ロコモジェン), 2002. 07. 04 (ファミリーなし)</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2002/016620 A2 (アクソーディア・リミテッド), 2002. 02. 28 &amp; JP 2004-522414 A &amp; EP 1309706 A2 &amp; US 2004/0 053869 A1</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2000/055323 A1 (マイトコー), 2000. 09. 21 &amp; JP 2003-524397 A &amp; EP</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	A	WO 2002/052007 A1 (株式会社ロコモジェン), 2002. 07. 04 (ファミリーなし)	1-13	A	WO 2002/016620 A2 (アクソーディア・リミテッド), 2002. 02. 28 & JP 2004-522414 A & EP 1309706 A2 & US 2004/0 053869 A1	1-13	A	WO 2000/055323 A1 (マイトコー), 2000. 09. 21 & JP 2003-524397 A & EP	1-13
引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号												
A	WO 2002/052007 A1 (株式会社ロコモジェン), 2002. 07. 04 (ファミリーなし)	1-13												
A	WO 2002/016620 A2 (アクソーディア・リミテッド), 2002. 02. 28 & JP 2004-522414 A & EP 1309706 A2 & US 2004/0 053869 A1	1-13												
A	WO 2000/055323 A1 (マイトコー), 2000. 09. 21 & JP 2003-524397 A & EP	1-13												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>29. 03. 2005</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>12. 4. 2005</p>												
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p>郵便番号 100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>上條 のぶよ</p> <p>4C 9454</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3451</p>												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	1161534 A1  WO 2002/026977 A1 (株式会社セルフリースサイエ ンス) , 2002. 04. 04 & AU7446700 A & GB2385054 A	1-13





## &lt;調査の対象について&gt;

請求の範囲1は、「シノビオリンの発現阻害物質」という所望の性質により定義された化合物を含む医薬組成物に関するものである。そして、請求の範囲1は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「シノビオリンの発現阻害物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、シノビオリンの発現阻害と神経細胞分化誘導との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲3-11に特定されているシノビオリンをコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNA、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合してプロモーター活性を阻害するデコイ核酸、又は、シノビオリンをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む神経細胞分化誘導剤について行った。